

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

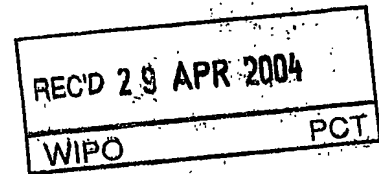
17. 3. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 3月17日

出願番号
Application Number: 特願2003-071979
[ST. 10/C]: [JP 2003-071979]



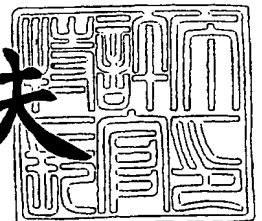
出願人
Applicant(s): 財団法人化学及血清療法研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 JP435YS

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 37/00
C12N 9/00

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 副島 見事

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 中垣 智弘

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県橿原市四条町 8 4 0 奈良県立医科大学内

【氏名】 松本 雅則

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県橿原市四条町 8 4 0 奈良県立医科大学内

【氏名】 藤村 吉博

【特許出願人】

【識別番号】 000173555

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号

【氏名又は名称】 財団法人化学及血清療法研究所

【代表者】 内野 矜自


【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056568

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1



【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 フォンビルブランド因子特異的切断酵素に対する抗体
の認識領域からなる構成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フォンビルブランド因子特異的切断酵素（以下、vWF C P
もしくはADAMTS-13と称することがある）に対する抗体が認識する、当該酵素の
中和エピトープ領域を包含するポリペプチドまたは当該ポリペプチドに由来する
ペプチド断片。

【請求項 2】 前記中和エピトープ領域が、配列表 1 記載のアミノ酸配列の
449 位から 687 位領域に存在するものである請求項 1 記載のポリペプチドま
たは当該ポリペプチドに由来するペプチド断片。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドまたは当該ポリペプ
チドに由来するペプチド断片に結合性を有する抗体。

【請求項 4】 抗ADAMTS-13抗体陽性患者血液中に存在する請求項 3 の抗体
。

【請求項 5】 非家族性血小板減少性紫斑病（以下、当該疾病を T T P と称
することがある）患者血液中に存在する請求項 3 または 4 記載の抗体。

【請求項 6】 ADAMTS-13を構成するポリペプチドの全配列または請求項 1
もしくは 2 に記載のポリペプチドまたは当該ポリペプチドに由来するペプチド断
片を構成要件とする抗体測定試薬。

【請求項 7】 T T P 患者の自己抗体を検出対象とする請求項 6 記載の抗体
測定試薬。

【請求項 8】 請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドもしくは当該ポリペ
プチドに由来するペプチド断片を本態とする抗ADAMTS-13抗体陽性患者処置用リ
ガンドまたは医薬組成物。

【請求項 9】 分子置換・欠失・挿入などの改変がなされ、抗ADAMTS-13抗
体との反応性が消失した請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドもしくは当該ポ
リペプチドに由来するペプチド断片を本態とする請求項 8 記載の抗ADAMTS-13抗
体陽性患者処置用リガンドまたは医薬組成物。

【請求項 10】抗ADAMTS-13抗体陽性患者の処置のための、患者への投与による抗体の中和に用いられる請求項 8 または 9 記載の医薬組成物。

【請求項 11】抗ADAMTS-13抗体陽性患者の処置のための、抗ADAMTS-13抗体に特異的なリガンドの、該リガンドが結合した担体を用いた使用であって、該処置は、該特異的なリガンドに対する該患者の血漿中の該特異的なリガンドに対する免疫グロブリンへの結合を達成する条件下で該患者の血漿を該担体に通過させ、それにより有意な部分の免疫グロブリンを患者の血漿から除去する工程、および該血漿を該患者へ再注入する工程を包含するプロセスに用いられる請求項 8 または 9 記載のリガンド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本願発明は、医療用医薬品の分野に関する。詳細には、血液凝固に関与するフォンビルブランド因子(von Willebrand Factor: 以下、vWFと称することがある)の特異的切断酵素(以下、ADAMTS-13と称することがある)に対する抗体(以下、本抗体を抗ADAMTS-13抗体と称することがある)が認識するエピトープ及び当該エピトープ領域を含むポリペプチドならびに当該ポリペプチドを認識する抗体に関する。

本願発明で提供されるADAMTS-13に対する抗体の認識するエピトープ領域を含むポリペプチドあるいはペプチド断片により、ADAMTS-13に対する自己抗体の有無の診断あるいは自己抗体の吸収剤あるいは自己抗体陽性にともなう疾病患者へのADAMTS-13の補充療法の可能性が拓かれる。

【0002】

【従来の技術並びに発明が解決しようとする課題】

vWFは、血管内皮細胞や骨髄巨核球で産生され、2050アミノ酸残基(モノマー約250kDa)からなる単一サブユニットがS-S結合にて結ばれたマルチマー構造(分子量500~20,000kDa)を持って存在している止血因子である。血中濃度は約10 μ g/mlで、一般に高分子量のものほど比活性が高い。

vWFには2つの大きな止血因子としての機能があり、1つは血液凝固第VIII因子と結合し、これを安定化させるキャリアー蛋白質としての働き、もう1つは傷害血管壁の血管内皮細胞下組織に血小板を粘着・凝集させ、血小板血栓を形成する機能である。

【0003】

血栓性血小板減少性紫斑病（以下、TTPと称することがある）は、全身の組織細動脈と毛細血管に血小板血栓を生じる疾患であり、今日の医療技術の進歩にもかかわらず、当該疾患での関連死亡率は1971～1991年にかけて約3倍に増加している。病理学的に、TTPは血管内皮細胞障害や血管内血小板凝集によって惹き起こされると考えられており、免疫組織学的には生じた血小板血栓中に多量のvWFの存在が認められ、vWFがこの成因に大きな役割を果たしていると考えられている。TTPには遺伝的素因を有すると考えられる家族性（先天性）のものと特に成人において発症する後天性（特発性）のものなどに大別される。TTP患者のvWFのマルチマー構造は正常もしくは高分子量が優位となっており、特に通常では見られない超高分子量のvWF (unusually large vWF multimer: ULvWFM) や高分子量vWF重合体 (large vWF multimer: LvWFM) が、高ずり応力下での血小板凝集の促進と微小血栓形成に大きな役割を果たしていることが推察される。一方で、vWFは健常人の循環血液中で高ずり応力下、vWF切断酵素(vWF-cleaving protease)の作用により842 Tyr - 843 Metの位置で分解を受けることが知られていた。したがって、TTPは血漿中の当該酵素活性が何らかの原因で低下して、ULvWFMないしLvWFMが増加して血小板凝集が亢進し、血管内に血小板血栓が形成されるためというシナリオが描かれている。

【0004】

2001年、前記酵素活性を有する活性本体であるvWF切断酵素、別名ADAMTS-13をコードする遺伝子が本願発明者等によりクローニングされた（例えば、特許文献1参照）。以下に、ADAMTS-13の分子構造に関する知見を整理する。括弧内におおよその目安となる開始コドン(ATG)のメチオニンからの残基番号の位置を示す（配列表1参照）。

ADAMTS-13のドメイン構成はSignal peptideに続いてPropeptideが存在し、次いで、Furinの切断モチーフのRQRR配列が存在し、HEXXHXXGXXHDのコンセンサス配列からなるReprolysinタイプの亜鉛キレート領域を含むMetalloprotease domainが続く(アミノ酸残基番号284位(P285X)まで)。そして、蛇毒メタロプロテアーゼで見出されるようなDisintegrin-like domainを経て(アミノ酸残基番号386位(W387X)まで)、一般的に分子認識に重要と考えられているおよそ50～60残基からなる最初のTsp1 motif (Tsp1-1) (アミノ酸残基番号448位(Q449X)まで)へとつながり、さらに、細胞接着モチーフの1つであるRGDS配列が含まれるCys-rich region(アミノ酸残基番号580位(T581X)まで)へと続く。次いで、システイン残基を全く含まない約130アミノ酸残基からなるSpacer domain(アミノ酸残基番号687位(W688X)まで)を経て、再びTsp1 motifの繰り返し(Tsp1-2～8)の後、補体成分C1rあるいはC1sの中に最初に見つかったとされるCUB domain-1, 2が続く。

【0005】

ところで、ADAMTS-13に対する主要な中和エпитープ領域に関しての知見はこれまでのところ全く得られていない。また、当該酵素に対する自己抗体陽性患者の簡便な診断法も確立されていない。

斯かる状況に鑑み、本願発明の第一の課題は、ADAMTS-13上に存在する中和エпитープの同定とそれにより発案される自己抗体を主たる対象とする抗体の中和・吸収材に係る発明である。

本願発明の第二の課題は、斯かる中和・吸収材の製造方法を提供することにある。

本願発明の第三の課題は、斯かる中和・吸収材の用途を提供することにある。

本願発明の第四の課題は、斯かるエпитープを改変することにより得られるvWF特異的切断酵素全長もしくは部分改変分子の製造方法を提供することにある。

本願発明の第五の課題は、斯かるエпитープを改変することにより得られるvWF特異的切断酵素全長もしくは部分改変分子の用途を提供することにある。

【0006】

vWF 特異的切断酵素の先天性欠損患者及び後天性の当該酵素に対する抗体陽性患者の治療法として、現在までプラズマ交換療法が施されており、当該酵素の精製品または遺伝子組換え体等純品による補充療法の確立が望まれる。家族性 TTP 患者は、先天性に vWF 特異的切断酵素が欠損しており、非家族性では後天的に当該酵素に対する自己抗体の産生が原因と報告されている。したがって、家族性 TTP 患者には、当該酵素の補充療法が望ましく（現実には血漿投与が行われている）、非家族性では、血漿交換による自己抗体の除去と当該酵素の補充が必要である。

しかし、自己抗体陽性患者への ADAMTS-13 の補充投与においては患者血液中に存在する当該酵素に対する抗体、すなわち自己抗体によって中和されることにより、投与された酵素は実質的には濃度が減ぜられる。しかし、先の出願（特願 2002-279924）の ADAMTS-13 に対する抗体のエピトープの決定方法、あるいは本願発明において同定された中和領域の利用ならびに本願発明において用いられた競合阻害法のウェスタンブロッティングを行うことにより新たに同定されうる中和エピトープ領域を部分改変した分子を調製することで、当該酵素に対する抗体陽性患者への投与が可能になる。あるいは本願発明によって提供される中和領域を含むポリペプチド等による抗体の吸収が可能になる。

【0007】

【特許文献 1】

特願 2002-123103 号

【特許文献 2】

特願 2002-279924 号

【0008】

【課題を解決するための手段、発明の構成】

上述の状況の下、本願発明者等は先の出願（特願 2002-123103）において vWF 切断酵素の単離同定を達成するべく、鋭意研究を重ねた結果、従来報告のなかった所望の vWF 切断酵素の精製単離に成功し、その成熟型蛋白質のアミノ酸配列及び当該アミノ酸配列をコードする遺伝子を同定するに至った。

そして、先の出願（特願 2002-123103）記載の遺伝子組換え技術を

利用して得られた知見に基づき、活性発現に必須と考えられる領域の特定が特願 2002-279924 に示されているが、この知見に基づいて調製された変異体分子を利用した本願発明の後天性 TTP 患者の抗 ADAMTS-13 に対する自己抗体の認識する主要中和領域解析の結果、その認識領域はこれと一致して、Cys-rich 領域（499 位程度）から Spacer 領域（687 位程度）に存在することが明らかとなった。よって、本願発明で提供される抗 ADAMTS-13 抗体に関する主要な中和エピトープ領域の主たる要件は、ADAMTS-13 を構成するポリペプチド中の Cys-rich 領域（499 位程度）から Spacer 領域（687 位程度）の領域または同等のアミノ酸配列を有するペプチド断片である。

【0009】

そして、この知見から得られる ADAMTS-13 のアミノ酸配列を基に調製される中和エピトープ領域のポリペプチド等を抗原にして、通常の免疫方法（Current Protocols in Molecular Biology, Edited by F.M. Ausbel et al. (1987)、Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Edited by J. McCafferty et al. (1996)、Antibodies: A Laboratory Manual, Edited by Harlow David Lane (1988)）あるいは ANTIBODY ENGINEERING second edition Edited by Carl A. K. BORREBAECK (1995)）によってモノクローナル及びポリクローナル抗体等の作製が可能である。あるいは、ファージディスプレイ技術を利用した抗体作製技術（Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual Edited by Brian K. Kay et al. (1996)、Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Edited by J. McCafferty et al. (1996)、あるいは ANTIBODY ENGINEERING second edition edited by Carl A. K. BORREBAECK (1995)）により当該蛋白質（ADAMTS-13）と結合する抗体の作出が可能である。あるいは、これらの技術に基づき、本酵素に対する自己抗体陽性である TTP 患者検体からの本酵素活性の中和抗体もしくは単なる結合抗体の単離も可能である。そして、これらの抗体を用いることで、本酵素量の変動を伴う疾病、例えば TTP などの疾患の診断及び治療への応用が可能となる。

【0010】

一実施態様において、本発明は、TTP 様の疾患または vWF 依存性の血栓症

の恐れのある患者を診断する方法に関し、該方法は、以下の工程を含む：

本酵素量の変動を伴う疾病に関する診断的アッセイは、患者からの生物学的試料を用いて行われる。これらの試料は、直接的に用いられることができ、またはいくつかの事例においては、アッセイを行う前に処置、例えば干渉する可能性のある試料中の物質を除去することなどを必要とすることができる。適した生物学的試料の例は、血液、尿、汗、組織または血清である。

【0011】

(a) 患者から得られた生物学的試料を、ADAMTS-13もしくはその部分ペプチド断片を固定化した固型支持物と接触させること；

(b) 固型支持物を、現像剤標識化抗ヒト免疫グロブリン抗体と接触させること；及び、(c) 試料中における抗ADAMTS-13抗体の濃度に相応する値を得るために、工程(b)において特異的に結合している現像剤の標識を検出すること。

【0012】

本願発明の他の実施態様として、本発明のポリペプチドは、抗ADAMTS-13抗体陽性患者への投与による自己抗体の中和剤としてまたは、自己抗体除去剤としても有用である。この方法において、ポリペプチドは、場合によっては適した支持物等、当該分野に公知の方法を用いて固定化される。次いで、除去すべき抗ADAMTS-13抗体を含む試料、たとえば患者血液と固定化したポリペプチドを接触させることで患者試料中から自己抗体を除去する。

【0013】

例えば、抗ADAMTS-13抗体陽性患者への投与による自己抗体の中和剤として本発明の抗ADAMTS-13抗体の認識するポリペプチドを使用する場合、生理食塩水、緩衝液等で希釈して製剤化し、医薬組成物を得ることもできる。製剤のpHは体液のpHに近い弱酸性～中性域のpHが望ましく、その下限は5.0～6.4が望ましく、その上限はpH 6.4～7.4が望ましい。また、凍結乾燥形態等の長期間保存可能な形態で提供することもでき、この場合使用時に水、生理食塩水、緩衝液等で所望の濃度になるように溶解して使用することができる。本発明の製剤は、通常医薬品に用いられる薬理学的に許容される添加剤（例えば担体、賦形剤、希釈剤等）、安定化剤または製薬上必要な成分を含有していてもよい。安定化

剤としては、グルコース等の単糖類、サッカロース、マルトース等の二糖類、マンニトール、ソルビトール等の糖アルコール、塩化ナトリウム等の中性塩、グリシン等のアミノ酸、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体（プルロニック）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（トウイーン）等の非イオン系界面活性剤、ヒトアルブミン等が例示され、1～10w/v%程度が添加されていることが好ましい。

本発明の医薬組成物は、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射等により有効量で投与することができ、1回または数回に分けて投与される。その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、1回あたり、0.001mg～100mgが好ましい。

【0014】

【発明の効果】

本願発明によりもたらされた知見により、この発明のポリペプチドは、抗ADAMTS-13抗体に対して特異的に免疫反応性を示す。したがって抗ADAMTS-13抗体量の迅速な検出、本酵素変動に伴う疾病の診断あるいは抗ADAMTS-13抗体の結合あるいは阻害活性の中和が可能となる。このように、本願発明で提供されるポリペプチドは、抗ADAMTS-13抗体の検出をはじめとする多種多様の用途を提供するものでもある。

本願発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると云える。

【0015】

以下に、実施例に従って本願発明を詳説するが、本願発明はこれら実施例に何等限定されるものではない。

【0016】

【実施例】

調製例 1

(ADAMTS-13C 末欠失変異体の作製)

先の特許出願（特願 2002-279924）記載の全長及びC末端より逐次ドメインを欠失させた変異体（Full1427、T1135X、W1016X、W897X、W808X、W746

X、W688X、T581X、Q449X、W387X、P285X、：それぞれの数字は開始コドン A T G のコードするMetから終結コドンまでのアミノ酸の残基数を示し、Xはstopコドンを表す。) 遺伝子発現ベクターを利用して、Hela細胞を用いて、以下の手順でトランスフェクトした。

まず初めに、トランスフェクションの24時間前に $1-3 \times 10^5$ 個/35mm dishで細胞を撚き、その翌日に上記発現ベクターを $2 \mu\text{g}$ 当たり $10 \mu\text{l}$ のPolyamine Transfection ReagentであるTransIT (TAKARA社製) をとり、Opti-MEM等の無血清培地 $200 \mu\text{l}$ に添加して、試薬添付文書に従い、DNAとのコンプレックスを調製後、準備しておいた前記各種細胞へ滴下し、6時間インキュベーションし、その72時間後、培地を回収した。それぞれの変異体を適宜濃縮したものを検出は抗FLAG-M2抗体 (コダック社製) を用いたウエスタンブロット法により、抗マウス Ig G-アルカリフォスファターゼ酵素標識抗体系で染色して行った (図1に発現の様子を確認した結果を示す。) 。

【0017】

実施例1

(ウエスタンブロットを利用した後天性TTP患者抗体のエピトープの解析)

常法により、プロテインAカラムを用いて後天性患者血漿よりIgG画分を調製し (抗体濃度約 $2-5 \text{ mg/ml}$)、それを200倍希釈してウエスタンブロットを行った。フィルターは二次抗体に抗ヒトIgGアルカリフォスファターゼ標識抗体を用いてBCIP/NBT基質により染色し可視化した (図2~4)。これらにより決定された抗体の認識領域は3者の抗体画分いずれにおいてもW688Xまで反応しQ449Xで反応しないことからQ449XよりもC末端側に存在することが確認された。

【0018】

実施例2

(競合阻害の原理に基づくウエスタンブロットを利用した後天性TTP患者抗体の詳細なエピトープの解析)

次にさらに詳細な本中和抗体の認識エピトープを絞り込むために、W688X及びFull-length wild typeの上清を電気泳動しPVDF膜へトランスファーしたものを、

前述の患者抗体を予め大過剰のQ449X、W688X、あるいはFull-length wild typeの発現上清の濃縮物とプレインキュベーションしたものを一次抗体反応液として用いることで競合阻害の系により、W688Xによりいずれの検体もFull-length wild typeの陽性バンドが消失することを確認した(図5)。

このことからこの3者の抗体はいずれもW688XよりもN末側を認識していることが示唆された。

【0019】

以上、実施例1, 2に示す結果により、用いた3者の自己抗体は、Q449X末側でW688XよりもN末側すなわちQ449XとW688Xの間であるCys-rich領域からSpacer領域が主要な中和領域であることが確認された。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE
 <120>Composition comprising peptide fragment(s) recognized by antibody against von Willebrand Factor cleaving protease
 <130>JP435YS

<160>1

<210>1

<211>1427

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

Met	His	Gln	Arg	His	Pro	Arg	Ala	Arg	Cys	Pro	Pro	Leu	Cys	Val
1				5					10					15
Ala	Gly	Ile	Leu	Ala	Cys	Gly	Phe	Leu	Leu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro
				20					25					30
Ser	His	Phe	Gln	Gln	Ser	Cys	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Pro	Gln	Ala
				35					40					45
Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala	Pro	Leu	Lys	Gly	Arg	Pro
				50					55					60
Pro	Ser	Pro	Gly	Phe	Gln	Arg	Gln	Arg	Gln	Arg	Gln	Arg	Arg	Ala
				65					70					75
Ala	Gly	Gly	Ile	Leu	His	Leu	Glu	Leu	Leu	Val	Ala	Val	Gly	Pro
				80					85					90
Asp	Val	Phe	Gln	Ala	His	Gln	Glu	Asp	Thr	Glu	Arg	Tyr	Val	Leu
				95					100					105
Thr	Asn	Leu	Asn	Ile	Gly	Ala	Glu	Leu	Leu	Arg	Asp	Pro	Ser	Leu
				110					115					120
Gly	Ala	Gln	Phe	Arg	Val	His	Leu	Val	Lys	Met	Val	Ile	Leu	Thr
				125					130					135

Glu Pro Glu Gly Ala Pro Asn Ile Thr Ala Asn Leu Thr Ser Ser	140	145	150
Leu Leu Ser Val Cys Gly Trp Ser Gln Thr Ile Asn Pro Glu Asp	155	160	165
Asp Thr Asp Pro Gly His Ala Asp Leu Val Leu Tyr Ile Thr Arg	170	175	180
Phe Asp Leu Glu Leu Pro Asp Gly Asn Arg Gln Val Arg Gly Val	185	190	195
Thr Gln Leu Gly Gly Ala Cys Ser Pro Thr Trp Ser Cys Leu Ile	200	205	210
Thr Glu Asp Thr Gly Phe Asp Leu Gly Val Thr Ile Ala His Glu	215	220	225
Ile Gly His Ser Phe Gly Leu Glu His Asp Gly Ala Pro Gly Ser	230	235	240
Gly Cys Gly Pro Ser Gly His Val Met Ala Ser Asp Gly Ala Ala	245	250	255
Pro Arg Ala Gly Leu Ala Trp Ser Pro Cys Ser Arg Arg Gln Leu	260	265	270
Leu Ser Leu Leu Ser Ala Gly Arg Ala Arg Cys Val Trp Asp Pro	275	280	285
Pro Arg Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly His Pro Pro Asp Ala Gln	290	295	300
Pro Gly Leu Tyr Tyr Ser Ala Asn Glu Gln Cys Arg Val Ala Phe	305	310	315
Gly Pro Lys Ala Val Ala Cys Thr Phe Ala Arg Glu His Leu Asp	320	325	330
Met Cys Gln Ala Leu Ser Cys His Thr Asp Pro Leu Asp Gln Ser	335	340	345
Ser Cys Ser Arg Leu Leu Val Pro Leu Leu Asp Gly Thr Glu Cys			

350	355	360
Gly Val Glu Lys Trp Cys Ser Lys Gly Arg Cys Arg Ser Leu Val		
365	370	375
Glu Leu Thr Pro Ile Ala Ala Val His Gly Arg Trp Ser Ser Trp		
380	385	390
Gly Pro Arg Ser Pro Cys Ser Arg Ser Cys Gly Gly Gly Val Val		
395	400	405
Thr Arg Arg Arg Gln Cys Asn Asn Pro Arg Pro Ala Phe Gly Gly		
410	415	420
Arg Ala Cys Val Gly Ala Asp Leu Gln Ala Glu Met Cys Asn Thr		
425	430	435
Gln Ala Cys Glu Lys Thr Gln Leu Glu Phe Met Ser Gln Gln Cys		
440	445	450
Ala Arg Thr Asp Gly Gln Pro Leu Arg Ser Ser Pro Gly Gly Ala		
455	460	465
Ser Phe Tyr His Trp Gly Ala Ala Val Pro His Ser Gln Gly Asp		
470	475	480
Ala Leu Cys Arg His Met Cys Arg Ala Ile Gly Glu Ser Phe Ile		
485	490	495
Met Lys Arg Gly Asp Ser Phe Leu Asp Gly Thr Arg Cys Met Pro		
500	505	510
Ser Gly Pro Arg Glu Asp Gly Thr Leu Ser Leu Cys Val Ser Gly		
515	520	525
Ser Cys Arg Thr Phe Gly Cys Asp Gly Arg Met Asp Ser Gln Gln		
530	535	540
Val Trp Asp Arg Cys Gln Val Cys Gly Gly Asp Asn Ser Thr Cys		
545	550	555
Ser Pro Arg Lys Gly Ser Phe Thr Ala Gly Arg Ala Arg Glu Tyr		
560	565	570

Val Thr Phe Leu Thr Val Thr Pro Asn Leu Thr Ser Val Tyr Ile	575	580	585
Ala Asn His Arg Pro Leu Phe Thr His Leu Ala Val Arg Ile Gly	590	595	600
Gly Arg Tyr Val Val Ala Gly Lys Met Ser Ile Ser Pro Asn Thr	605	610	615
Thr Tyr Pro Ser Leu Leu Glu Asp Gly Arg Val Glu Tyr Arg Val	620	625	630
Ala Leu Thr Glu Asp Arg Leu Pro Arg Leu Glu Glu Ile Arg Ile	635	640	645
Trp Gly Pro Leu Gln Glu Asp Ala Asp Ile Gln Val Tyr Arg Arg	650	655	660
Tyr Gly Glu Glu Tyr Gly Asn Leu Thr Arg Pro Asp Ile Thr Phe	665	670	675
Thr Tyr Phe Gln Pro Lys Pro Arg Gln Ala Trp Val Trp Ala Ala	680	685	690
Val Arg Gly Pro Cys Ser Val Ser Cys Gly Ala Gly Leu Arg Trp	695	700	705
Val Asn Tyr Ser Cys Leu Asp Gln Ala Arg Lys Glu Leu Val Glu	710	715	720
Thr Val Gln Cys Gln Gly Ser Gln Gln Pro Pro Ala Trp Pro Glu	725	730	735
Ala Cys Val Leu Glu Pro Cys Pro Pro Tyr Trp Ala Val Gly Asp	740	745	750
Phe Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Gly Gly Leu Arg Glu Arg	755	760	765
Pro Val Arg Cys Val Glu Ala Gln Gly Ser Leu Leu Lys Thr Leu	770	775	780
Pro Pro Ala Arg Cys Arg Ala Gly Ala Gln Gln Pro Ala Val Ala			

785	790	795
Leu Glu Thr Cys Asn Pro Gln Pro Cys Pro Ala Arg Trp Glu Val		
800	805	810
Ser Glu Pro Ser Ser Cys Thr Ser Ala Gly Gly Ala Gly Leu Ala		
815	820	825
Leu Glu Asn Glu Thr Cys Val Pro Gly Ala Asp Gly Leu Glu Ala		
830	835	840
Pro Val Thr Glu Gly Pro Gly Ser Val Asp Glu Lys Leu Pro Ala		
845	850	855
Pro Glu Pro Cys Val Gly Met Ser Cys Pro Pro Gly Trp Gly His		
860	865	870
Leu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu Lys Ala Pro Ser Pro Trp Gly		
875	880	885
Ser Ile Arg Thr Gly Ala Gln Ala Ala His Val Trp Thr Pro Ala		
890	895	900
Ala Gly Ser Cys Ser Val Ser Cys Gly Arg Gly Leu Met Glu Leu		
905	910	915
Arg Phe Leu Cys Met Asp Ser Ala Leu Arg Val Pro Val Gln Glu		
920	925	930
Glu Leu Cys Gly Leu Ala Ser Lys Pro Gly Ser Arg Arg Glu Val		
935	940	945
Cys Gln Ala Val Pro Cys Pro Ala Arg Trp Gln Tyr Lys Leu Ala		
950	955	960
Ala Cys Ser Val Ser Cys Gly Arg Gly Val Val Arg Arg Ile Leu		
965	970	975
Tyr Cys Ala Arg Ala His Gly Glu Asp Asp Gly Glu Glu Ile Leu		
980	985	990
Leu Asp Thr Gln Cys Gln Gly Leu Pro Arg Pro Glu Pro Gln Glu		
995	1000	1005

Ala Cys Ser Leu Glu Pro Cys Pro Pro Arg Trp Lys Val Met Ser
1010 1015 1020
Leu Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Leu Gly Thr Ala Arg Arg
1025 1030 1035
Ser Val Ala Cys Val Gln Leu Asp Gln Gly Gln Asp Val Glu Val
1040 1045 1050
Asp Glu Ala Ala Cys Ala Ala Leu Val Arg Pro Glu Ala Ser Val
1055 1060 1065
Pro Cys Leu Ile Ala Asp Cys Thr Tyr Arg Trp His Val Gly Thr
1070 1075 1080
Trp Met Glu Cys Ser Val Ser Cys Gly Asp Gly Ile Gln Arg Arg
1085 1090 1095
Arg Asp Thr Cys Leu Gly Pro Gln Ala Gln Ala Pro Val Pro Ala
1100 1105 1110
Asp Phe Cys Gln His Leu Pro Lys Pro Val Thr Val Arg Gly Cys
1115 1120 1125
Trp Ala Gly Pro Cys Val Gly Gln Gly Thr Pro Ser Leu Val Pro
1130 1135 1140
His Glu Glu Ala Ala Ala Pro Gly Arg Thr Thr Ala Thr Pro Ala
1145 1150 1155
Gly Ala Ser Leu Glu Trp Ser Gln Ala Arg Gly Leu Leu Phe Ser
1160 1165 1170
Pro Ala Pro Gln Pro Arg Arg Leu Leu Pro Gly Pro Gln Glu Asn
1175 1180 1185
Ser Val Gln Ser Ser Ala Cys Gly Arg Gln His Leu Glu Pro Thr
1190 1195 1200
Gly Thr Ile Asp Met Arg Gly Pro Gly Gln Ala Asp Cys Ala Val
1205 1210 1215
Ala Ile Gly Arg Pro Leu Gly Glu Val Val Thr Leu Arg Val Leu

1220	1225	1230
Glu Ser Ser Leu Asn Cys Ser Ala Gly Asp Met Leu Leu Leu Trp		
1235	1240	1245
Gly Arg Leu Thr Trp Arg Lys Met Cys Arg Lys Leu Leu Asp Met		
1250	1255	1260
Thr Phe Ser Ser Lys Thr Asn Thr Leu Val Val Arg Gln Arg Cys		
1265	1270	1275
Gly Arg Pro Gly Gly Gly Val Leu Leu Arg Tyr Gly Ser Gln Leu		
1280	1285	1290
Ala Pro Glu Thr Phe Tyr Arg Glu Cys Asp Met Gln Leu Phe Gly		
1295	1300	1305
Pro Trp Gly Glu Ile Val Ser Pro Ser Leu Ser Pro Ala Thr Ser		
1310	1315	1320
Asn Ala Gly Gly Cys Arg Leu Phe Ile Asn Val Ala Pro His Ala		
1325	1330	1335
Arg Ile Ala Ile His Ala Leu Ala Thr Asn Met Gly Ala Gly Thr		
1340	1345	1350
Glu Gly Ala Asn Ala Ser Tyr Ile Leu Ile Arg Asp Thr His Ser		
1355	1360	1365
Leu Arg Thr Thr Ala Phe His Gly Gln Gln Val Leu Tyr Trp Glu		
1370	1375	1380
Ser Glu Ser Ser Gln Ala Glu Met Glu Phe Ser Glu Gly Phe Leu		
1385	1390	1395
Lys Ala Gln Ala Ser Leu Arg Gly Gln Tyr Trp Thr Leu Gln Ser		
1400	1405	1410
Trp Val Pro Glu Met Gln Asp Pro Gln Ser Trp Lys Gly Lys Glu		
1415	1420	1425
Gly Thr		
1427		

【図面の簡単な説明】

【図1】 調製されたC末欠変異体の発現を抗FLAG抗体を用いて非還元ウェスタンブロットにてその存在量を確認した図である。

【図 2】 後天性 TTP 患者 003 に由来する精製 IgG による非還元下ウェスタンブロットによる認識領域の確認を行った図である。

【図 3】 後天性 TTP 患者 004 に由来する精製 IgG による非還元下ウェスタンブロットによる認識領域の確認を行った図である。

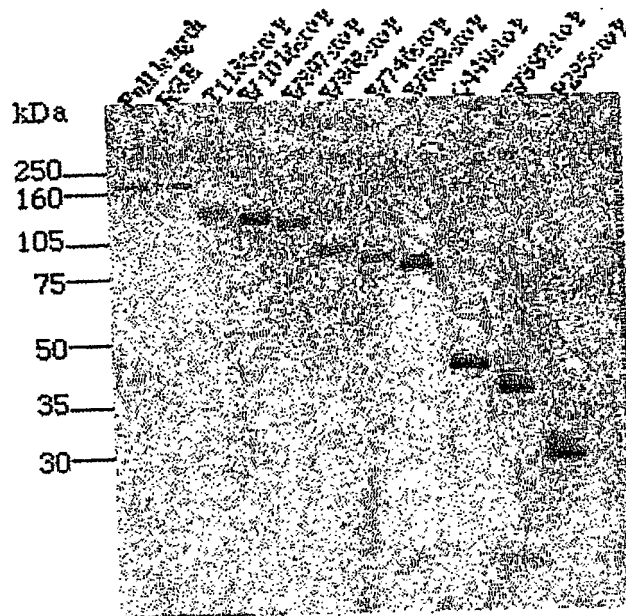
【図 4】 後天性 TTP 患者 009 に由来する精製 IgG による非還元下ウェスタンブロットによる認識領域の確認を行った図である。

【図 5】 後天性 TTP 患者に由来する精製 IgG のより詳細な認識領域の確認を行った図である。

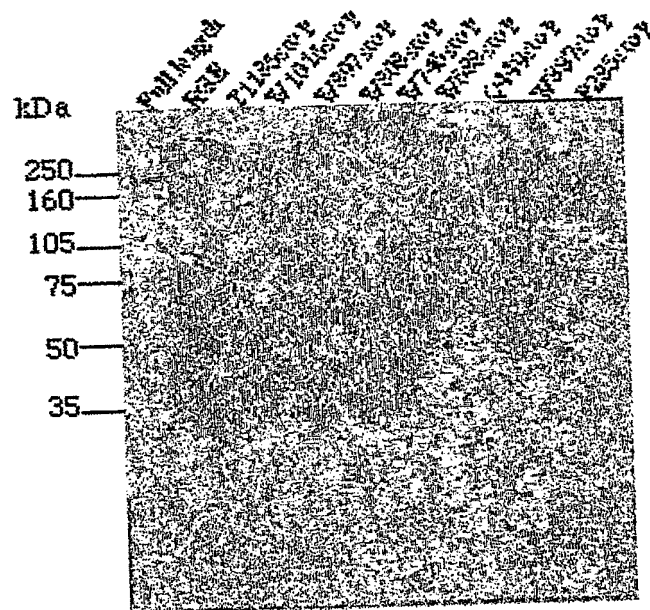
【書類名】

図面

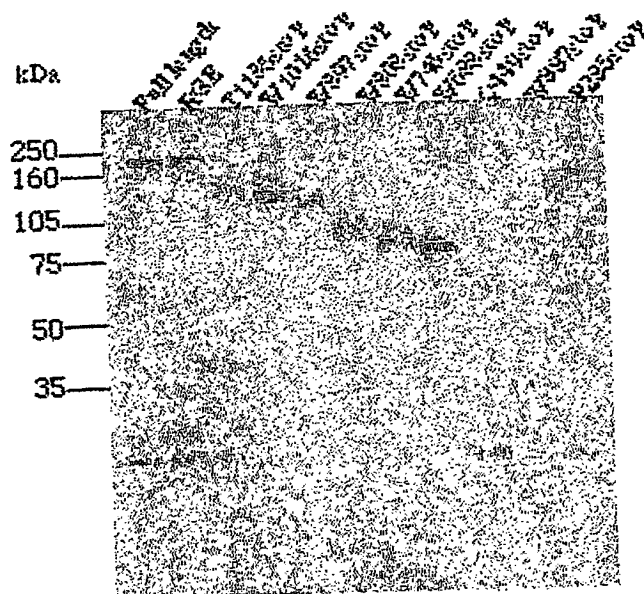
【図 1】



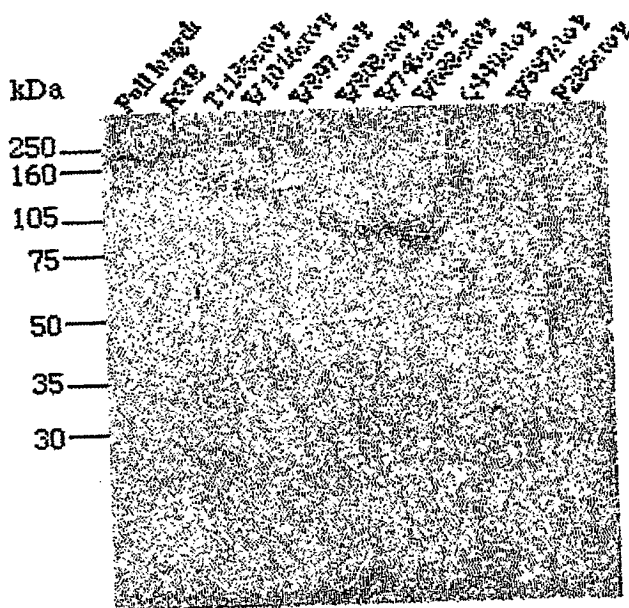
【図 2】



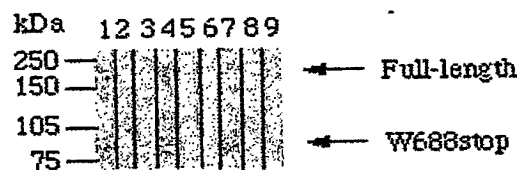
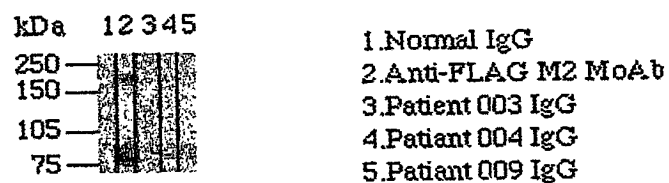
【図 3】



【図 4】



【図 5】



1. Patient 003 IgG with Q449 sup
2. Patient 003 IgG with W688 sup
3. Patient 003 IgG with Full sup
4. Patient 004 IgG with Q449 sup
5. Patient 004 IgG with W668 sup
6. Patient 004 IgG with Full sup
7. Patient 009 IgG with Q449 sup
8. Patient 009 IgG with W688 sup
9. Patient 009 IgG with Full sup

Fig. 5

【書類名】

要約書

【要約】

【目的】フォンビルブランド因子(von Willebrand Factor: 以下、vWFと称することがある)の特異的切断酵素(以下、ADAMTS-13と称することがある)に対する抗体(以下、本抗体を抗ADAMTS-13抗体と称することがある)が認識するエピトープ及び当該エピトープ領域を含むポリペプチドを提供する。

【構成】抗ADAMTS-13抗体が認識するADAMTS-13を構成するアミノ酸配列の449位から687位領域に存在するポリペプチドまたは当該ポリペプチドに由来するペプチド断片。

認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2003-071979

受付番号

50300432138

書類名

特許願

担当官

第五担当上席 0094

作成日

平成15年 3月18日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成15年 3月17日

次頁無

特願 2003-071979

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000173555]

1. 変更年月日

1996年 3月 4日

[変更理由]

住所変更

住 所

熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

氏 名

財団法人化学及血清療法研究所